

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-304384

(43)Date of publication of application : 28.11.1997

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/531

(21)Application number : 08-139639

(71)Applicant : JAPAN SYNTHETIC RUBBER CO LTD

(22)Date of filing : 09.05.1996

(72)Inventor : MURATA MITSUHIRO
HAN KAKUN

(54) IMMUNOASSAY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently detect an analical subject contained in an animal-derived substance used as a specimen by performing an antigen-antibody reaction under the presence of conjugate diene-based polymer containing sulfonic group and/or sulfonate.

SOLUTION: This is an immunoassay for performing an antigen-antibody reaction under the presence of conjugate diene-based polymer containing sulfonic group and/or sulfonate. Specimens possible of detecting pathogenic fungi or living substances by this method are animals, especially animal-derived substances such as blood, saliva, urine, excrement, seat, etc., of a human. Protein, peptide, saccharine, and lipid are listed as antigens and antibodys. This method does not have such problems as occurring pseudo-positive reaction caused by specified connecting reaction, even when a measurement is performed using fresh blood, blood serum, or blood plasma. This method allows quick and accurate examination in an emergency medical treatment.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 31.05.2005

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-304384

(43) 公開日 平成9年(1997)11月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 2 1		G 0 1 N 33/543	5 2 1
33/531			33/531	B

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-139639

(22) 出願日 平成8年(1996)5月9日

(71) 出願人 000004178

日本合成ゴム株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(72) 発明者 村田 充弘

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合
成ゴム株式会社内

(72) 発明者 范 可君

東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合
成ゴム株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫測定法

(57) 【要約】

【目的】 動物、特にヒトの病気の診断、妊娠の診断、便潜血の有無の判定、HBs検査などを目的として、血液、唾液、尿、糞便、汗などの動物由来物質を検体としてこれに含有される被検出物質を、抗原-抗体反応を利用して検出する免疫測定法を効率よく行う。

【構成】 スルホン酸基および／またはその塩を含有する共役ジエン系(共)重合体の存在下に、抗原抗体反応を行うことを特徴とする免疫測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スルホン酸基および／またはその塩を含有する共役ジエン系（共）重合体の存在下に、抗原抗体反応を行うことを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は動物、特にヒトの病気の診断、妊娠の診断、便潜血の有無の判定、HBs検査などを目的として、血液、唾液、尿、糞便、汗などの動物由来物質を検体としてこれに含有される被検出物質を、抗原-抗体反応を利用して検出する免疫測定法に関する。

【0002】

【従来技術】従来より、検体中に低濃度で存在する病原体または生理活性物質を検出するための簡便で、かつ信頼性が高く、さらに危険性がなく、感度の高い方法が求められているが、低濃度の生活性物質を検出することは、通常その検査に用いることのできる試料の量が非常に制限されているような臨床検査の分野においては非常に難しいことであった。このような病原体または生理活性物質の検出方法として、抗原-抗体反応を利用した免疫学的検出法があり、この方法は特異性が高く、ヒトの臨床検査や診断、動物の病気の診断などに広く用いられている。このような免疫学的検出法としては、例えば放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、血球凝集法、イムノクロマトグラフ法等が挙げられる。特に最近では救急医療の分野で即時検査の必要性が高まっているが、このような場面で、新鮮な血液等を用いて病原体または生理活性物質等の測定を行うと擬陽性反応が起こり、問題となることが判明した。さらに、分析試料がどのようにして得られたかに関係なく、また測定従事者の手法の優劣に関係なく、即座に正確な測定結果を得ることが求められている。

【0003】

【課題を解決する手段】本発明は、スルホン酸基および／またはその塩を含有する共役ジエン系（共）重合体（以下、「特定スルホン化（共）重合体」という）の存在下に、抗原抗体反応を行うことを特徴とする免疫測定法を提供するものである。以下、本発明を詳細に説明する。これにより本発明の目的、構成および効果が明確となるであろう。

【0004】検体

本発明により病原体または生活性物質の検出を行うことができる検体としては、動物、特にヒトの血液、唾液、尿、糞便、汗などの動物由来物質を挙げることができる。また、抗原または抗体としては、タンパク、ペプチド、糖質、脂質などであり、具体的には各種血液型を判定する輸血・免疫血液学的検査；補体価の検査；寄生虫、ウイルス、細菌などによる感染を検出する感染症関

連抗体検査；坑スギ抗体、坑ダニ抗体、坑自己抗体などを検出する免疫関連抗体検査；黄体形成ホルモン、成長ホルモンなどを検出する内分泌系検査；糖化ヘモグロビンを検出する糖尿病関連検査；各種腫瘍マーカーや便潜血などを検出する癌関連検査；凝固因子を検出する凝固系検査、などの様々な検査に適用することができる。

特定スルホン化（共）重合体

本発明において使用される特定スルホン化（共）重合体は、共役ジエン系単量体単位を必須の構成単位として含有し、スルホン酸基およびその塩から選ばれるすくなくとも1種の基（以下、これらの基をまとめて「スルホン酸基等」という。）を2mmol/g以上含有し、かつポリスチレンスルホン酸ナトリウム換算重量平均分子量が3,000以上である（共）重合体からなり抗原抗体反応における非特異的結合反応を抑制する作用を有するものである。特定スルホン化（共）重合体中のスルホン酸基等の総含量は、2mmol/g以上であることが必要であり、好ましくは4mmol/g以上、さらに好ましくは4.2～7.5mmol/gである。この場合、スルホン酸基等の総含量が2mmol/g未満であると、非特異的結合反応を抑制する作用が不十分となる。また、特定スルホン化（共）重合体のポリスチレンスルホン酸ナトリウム換算の重量平均分子量（以下、「Mw」という。）は3,000以上であることが必要であり、好ましくは4,000～500,000、特に好ましくは5,000～500,000である。Mwが3,000未満であると、非特異的結合反応を抑制する作用が不十分となる。なお、Mwの上限には特に臨界性はないが、その値が高すぎると、水溶液の粘度が高くなって検体との混和性が損なわれ、非特異的結合反応を抑制する作用が低下する場合がある。

【0005】ここで、特定スルホン化（共）重合体に含有されるスルホン酸の塩は、スルホン酸基を、アルカリ金属化合物、アルカリ土類金属化合物、アンモニウム等の塩基性化合物で中和した基である。特定スルホン化

（共）重合体としては、下記（I）および（II）に示すものを挙げることができる。

（I）共役ジエンおよび必要に応じてこれと共重合可能な他の単量体（以下、単に「他の単量体」という。）を（共）重合して、共役ジエン系（共）重合体を合成したのち、スルホン化して得られる（共）重合体（以下、「スルホン化（共）重合体（I）」という。）、（II）共役ジエンのスルホン化物および必要に応じて他の単量体を（共）重合して得られる（共）重合体（以下、「スルホン化（共）重合体（II）」という。）。

【0006】スルホン化（共）重合体（I）は、例えば特開平2-227403号公報に記載されているような下記（a）および（b）の方法によって製造することができる。

（a） 共役ジエンおよび必要に応じて他の単量体を、

過酸化水素、ベンゾイルパーオキサイド、アゾビスイソブチロニトリル等のラジカル重合開始剤あるいはn-ブチリチウム、ナトリウムナフタレン、金属ナトリウム等のアニオン重合開始剤の存在下、通常、-100~150℃、好ましくは0~130℃で、(共)重合を行い、共役ジエン系(共)重合体を合成する。ここで使用される共役ジエンとしては、例えば1,3-ブタジエン、1,3-ペンタジエン、イソプレン、1,3-ヘキサジエン、2,4-ヘキサジエン、2,3-ジメチル-1,3-ブタジエン、2-エチル-1,3-ブタジエン、1,3-ヘプタジエン、2,4-ヘプタジエン、2-フェニル-1,3-ブタジエン等の鎖状または分岐状の脂肪族共役ジエンを挙げることができる。これらの共役ジエンは、1種単独でまたは2種以上を使用することができる。また、他の単量体としては、例えばスチレン、 α -メチルスチレン、 o -メチルスチレン、 m -メチルスチレン、 p -メチルスチレン、2-ビニルピリジン、3-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン等の重合性二重結合含有芳香族化合物；アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸n-プロピル、アクリル酸i-プロピル、アクリル酸n-ブチル、アクリル酸t-ブチル、アクリル酸2-エチルヘキシル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸n-プロピル、メタクリル酸i-プロピル、メタクリル酸n-ブチル、メタクリル酸t-ブチル、メタクリル酸2-エチルヘキシル、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等の(メタ)アクリル酸アルキルエステル；アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、マレイン酸、フマル酸、イタコン酸等の重合性二重結合含有モノカルボン酸もしくはジカルボン酸または該ジカルボン酸の無水物；アクリロニトリル、メタクリロニトリル、シアン化ビニルデン等の重合性二重結合含有シアン化合物；塩化ビニル、塩化ビニリデン、ビニルメチルエチルケトン、ビニルメチルエーテル、酢酸ビニル、ギ酸ビニル、酢酸アリル、酢酸メタアリル、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-メチロールアクリルアミド、N-メチロールメタクリルアミド、アクリル酸グリシジル、メタアクリル酸グリシジル、アクロレイン、アリルアルコール等の前記以外の重合性二重結合含有化合物を挙げることができる。他の単量体としては、重合性二重結合含有芳香族化合物が好ましく、特にスチレンが好ましい。これらの他の単量体は1種単独であるいは2種以上を使用することができる。前記他の単量体を使用する場合の共重合量は、全単量体の、通常、80重量%未満、好ましくは60重量%未満、特に好ましくは50重量%未満である。(a)の方法により合成される共役ジエン系(共)重合体は、ブロック型でもランダム型でもよい。

【0007】(b)次に、共役ジエン系(共)重合体をスルホン化する。共役ジエン系(共)重合体のスルホン

化は、該共役ジエン系(共)重合体中の二重結合を無水硫酸、発煙硫酸、クロロスルホン酸、亜硫酸水素ナトリウム等のスルホン化剤を用いて行うが、好ましくは無水硫酸の単独使用のほか、さらに好ましくは無水硫酸と電子供与性化合物との錯体を使用される。ここで、電子供与性化合物としては、N,N-ジメチルホルムアミド、ジオキサン、ジブチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等のエーテル類；ピリジン、ピペラジン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミン等のアミン類；ジメチルスルフィド、ジエチルスルフィド等のスルフィド類；アセトニトリル、エチルニトリル、プロピルニトリル等のニトリル類等が挙げられ、なかでも、N,N-ジメチルホルムアミドおよびジオキサンが好ましい。前記無水硫酸と電子供与性化合物との錯体によるスルホン化方法は、まず、共役ジエン系(共)重合体を前記電子供与性化合物にそのまま溶解させるか、あるいは共役ジエン系(共)重合体を無水硫酸に不活性な溶媒に溶解させておき、別容器で反応させて得た前記錯体を適量添加し反応させることにより行われる。ここで、無水硫酸に不活性な溶媒としては、例えばクロロホルム、ジクロロメタン、ジクロロエタン、テトラクロロエタン、テトラクロロエチレン、ニトロメタン、ニトロベンゼン、プロパン、ブタン、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、液体二酸化イオウ等が挙げられる。これらの溶媒は、1種単独でまたは2種以上を使用することができる。前記スルホン化剤として無水硫酸または無水硫酸と電子供与性化合物との錯体を使用する場合は、共役ジエン系(共)重合体に無水硫酸が結合した中間体(共役ジエン系(共)重合体のスルホン酸エステル、以下「中間体」という)が生成する。この場合は、次いで中間体に水またはアルカリ金属化合物(好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等)、アルカリ土類金属化合物(好ましくは水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等)、アンモニア等の塩基性化合物を作用させることにより、二重結合が開裂してスルホン酸基等が結合した単結合になるか、あるいは二重結合は残ったまま、共役ジエン系(共)重合体中の水素原子がスルホン酸基等と置換することによって、スルホン化(共)重合体(I)が得られる。

【0008】また、スルホン化(共)重合体(II)は、下記(c)および(d)の方法によって製造することができる。

(c) 共役ジエンのスルホン化物を合成する。ここで使用される共役ジエンとしては、例えば1,3-ブタジエン、1,3-ペンタジエン、イソプレン、1,3-ヘキサジエン、2,4-ヘキサジエン、2,3-ジメチル-1,3-ブタジエン、2-エチル-1,3-ブタジエン、1,3-ヘプタジエン、2,4-ヘプタジエン、2-フェニル-1,3-ブタジエン等の鎖状または分岐状の脂肪族共役ジエンを挙げることができる。これらの共

役ジエンは、1種単独でまたは2種以上を使用することができる。共役ジエンのスルホン化は、日本化学会編集、新実験化学講座（14巻III、1773頁）に示されているような条件で、すなわち共役ジエンをそのまま、あるいは適当な溶媒中に溶解させた状態で、スルホン化剤中に滴下することによって行うことができる。この場合に用いられるスルホン化剤としては、好ましくは無水硫酸の単独使用のほか、さらに好ましくは無水硫酸と電子供与性化合物との錯体を使用される。ここで使用する電子供与性化合物および溶媒は、前記スルホン化

（共）重合体（I）の製造方法において例示した電子供与性化合物および溶媒と同様のものを挙げることができる。かくして、共役ジエンに無水硫酸が結合した環状中間体（共役ジエンの環状スルホン酸エステル、一般名称スルトン、以下「環状中間体」という）が生成する。この環状中間体にアルカリ金属化合物（好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等）、アルカリ土類金属化合物（好ましくは水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等）、アンモニア等の塩基性化合物を作用させ、スルホン酸塩基が結合した共役二重結合を有する単量体に変化させることによって、スルホン酸塩基を含有する共役ジエンのスルホン化物が得られる。また、前記環状中間体に水あるいはアルコールを加えたのち、脱水反応や脱アルコール反応を行なうことによって、スルホン酸基を含有する共役ジエンのスルホン化物が得られる。

【0009】（d）次に、前記のようにして得られた共役ジエンのスルホン化物および必要に応じて他の単量体を、ラジカル重合開始剤またはアニオン重合開始剤の存在下、通常、 $-100 \sim 150^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 130^{\circ}\text{C}$ で（共）重合を行うことにより、スルホン化（共）重合体（II）が製造される。ここで、共役ジエンのスルホン化物は、1種単独でまたは2種以上を使用することができる。また、共役ジエンのスルホン化物と共重合することができる他の単量体としては、スルホン化（共）重合体（I）の製造方法において例示したものと同様の他の単量体およびそれらのスルホン化物（例えばスチレンスルホン酸やその塩等）を挙げることができる。前記他の単量体の共重合割合は、得られる共重合体のスルホン酸基等の総含量が本発明の範囲内となるように決定されるが、通常、80重量%未満、好ましくは60重量%未満、特に好ましくは50重量%未満である。（d）の方法により合成されるスルホン化（共）重合体（II）は、ブロック型でもランダム型でもよい。本発明において、前記スルホン化（共）重合体（I）およびスルホン化（共）重合体（II）は、それぞれ1種単独でまたは2種以上を使用することができ、またスルホン化（共）重合体（I）とスルホン化（共）重合体（II）とを併用してもよい。

【0010】本発明における特定スルホン化（共）重合体の使用量は、検体の全量に対する特定スルホン化

（共）重合体の濃度が非特異的結合反応を抑制するに十分な量とする必要があり、例えば、検体の全液量に対する特定スルホン化（共）重合体の濃度で、 0.05 mg/ml より大きな値となるようにするのが好ましく、 $0.06 \sim 10 \text{ mg/ml}$ の範囲にある場合がより好ましく、 $0.1 \sim 5 \text{ mg/ml}$ の範囲にある場合が特に好ましい。

【0011】本発明が適用できる免疫測定法としては測定系として特に限定されるものではなく、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定法、免疫比濁法、ラテックス凝集法、血球凝集法などが利用できるが、特にイムノクロマトグラフ法が好適に用いられる。イムノクロマトグラフ法は、試料中の検出すべき被検出物質と結合可能な固定化試薬を含む少なくとも一つの反応部位を有するクロマトグラフ媒体を用い、このクロマトグラフ媒体上で標識微粒子を試料とともにまたは試料に引き続いてクロマトグラフ的に移動させると共に、前記試料を前記反応部位に接触させ、これにより、前記試料中に被検出物質が存在するときに前記反応部位において前記固定化試薬に被検出物質を介して前記標識微粒子が特異的に結合して補足されることを利用して前記被検出物質を検出する。このイムノクロマトグラフ法に適した標識微粒子としては、固定化試薬の活性または他の試薬や分析対象物を妨害することなく固定化試薬を結合できるものが含まれる。該粒子は検出可能でなければならないが、比較的低濃度で存在するときでも視覚的に検出可能なものが望ましい。該粒子としては、コロイド状金属粒子または合成高分子よりなるラテックス粒子が望ましい。コロイド状金属粒子としては、金属、または金属酸化物、金属水酸化物や金属塩を含む金属化合物からなる粒子があげられる。粒子は純粋な金属または金属化合物からなっているてもよいが、金属または金属化合物をコーティングしたポリマー核を有するものからなっているてもよい。適当な金属または金属化合物としては、例えば、プラチナ、金、銀および銅などの金属；ヨウ化銀、臭化銀、水酸化銀、酸化鉄、水酸化鉄または水和酸化鉄、水酸化アルミニウムまたは水和酸化アルミニウム、水酸化クロムまたは水和水酸化クロム、硫酸銅、硫酸水銀、硫酸バリウム、二酸化チタンなどの金属化合物からなる群から選ばれたものがあげられる。好ましいコロイド状金属微粒子としては、金、銀または酸化鉄からなる粒子があげられる。

【0012】合成高分子よりなるラテックス粒子としては、ラテックス粒子を油性染料により染色して得られるもので、特に水系媒体中のラテックス粒子を油性染料の油性有機溶剤による溶液のエマルジョンにより染色して得られる標識着色粒子があげられる。以上のような標識微粒子が、検出すべき被検出物質に特異的に結合する物質によって感作されることにより、感作微粒子が製造され、例えば被検出物質が抗原である場合には当該抗

原に対する抗体により、標識微粒子を一般的な方法で感作させればよい。

【0013】イムノクロマトグラフ法は、上記のようにして得られる感作微粒子を用いて、例えば次のようにして実施される。ここでは被検出物質が抗原の場合について説明を行うが、被検出物質が抗体であっても適用できるのは当然である。

①被検出物質である抗原に対する固定化試薬である抗体の溶液を、クロマトグラフ媒体に固定化する手段、当該抗体により感作された固層ラテックス粒子よりなる固定化試薬を、クロマトグラフ媒体に固定化する手段などにより、適宜のクロマトグラフ媒体の適宜の位置に反応部位を形成する。ここで用いられるイムノクロマトグラフ媒体は、感作微粒子が安定にまた、良好にクロマトグラフ的に移動して十分な展開がなされ、反応部位に確実に到達し得るよう、感作微粒子の粒径より大きなポアサイズを有することが必要であり、具体的には例えばガラスやシリカなどの無機繊維からなる濾紙をクロマトグラフ媒体として使用することができる、また、ニトロセルロースのような変性セルロースからなる濾紙も使用することが出来る。

【0014】②感作微粒子と試料とを接触させ、さらに望ましくない非特異的結合反応を実質的に防止するのに十分な量の特定スルホン化（共）重合体を添加する。この混合液を反応部位を有する上記クロマトグラフ媒体状態でクロマトグラフ的に移動させる。具体的には、感作微粒子の分散液と試料液とを混合し、次に特定スルホン化（共）重合体を添加し、この混合液にクロマトグラフ媒体の一端を接触させることにより、当該混合液を、それが十分に反応部位に到達するように展開させればよい。

ここにおける混合液中の感作微粒子の濃度は、通常0.0001～0.05重量%である。これにより、試料中に被検出物質である抗原が含有させる場合には、感作微粒子に試料中の抗原が特異反応により結合すると共に、抗原がクロマトグラフ媒体の反応部位における固定化試薬である抗体に結合する結果、感作微粒子が反応部位に捕捉される。上記②のように感作微粒子に試料を接触させる代わりに、クロマトグラフ媒体の反応部位とクロマトグラフ媒体の試料を接触させる部位との間に、感作微粒子をあらかじめ保持して乾燥させておき、その状態で試料と特定スルホン化（共）重合体の混合液をクロマトグラフ媒体と接触させ、毛細管現象により試料と感作微粒子をクロマトグラフ媒体状態で移動させるようにしてもよい。この際、感作微粒子はクロマトグラフ媒体に接している別の多孔性素材中に保持させ乾燥させてもよい。この場合にも、試料中に検出物質である抗原が含有される場合には、上記と同様に、クロマトグラフ媒体の反応部位に感作微粒子が捕捉される。ここに、使用される感作微粒子は、コロイド状金属粒子あるいは着色粒子よりなるものであるため、反応部位の形状に従ってコロ

イド状金属粒子あるいは着色粒子の色が現れる。従って、この発色シグナルの有無あるいはさらに色の濃さを目視により判定することにより、試料中における被検出物質である抗原の存在の有無、量などが検出される。

【0015】

【実施例】以下、本発明の実施例について説明するが、本発明がこれらによって限定されるものではない。

実施例1

＜標識着色粒子の調製（染色エマルジョン法）＞赤色の油溶性染料「ソルベントレッド27」（20℃におけるトルエンへの溶解度8.5g/100ml）の濃度2.5重量%のトルエン溶液よりなる染料溶液1重量部に、濃度0.25重量%のドデシル硫酸ナトリウム水溶液5.7重量部を加え、超音波分散機「US300型」（日本精機制作所社製）で染料溶液を分散させて赤色染料エマルジョンを調製した。上記赤色染料エマルジョンの42gを、モノマーとしてスチレン95重量部およびメタクリル酸5重量部を用い、過硫酸カリウムを重合開始剤としてソーブフリー重合により得られた、粒径0.270μm、表面負荷電量0.114meqCOO⁻/gのラテックス粒子による固形分10重量%のエマルジョン100gに加えて24時間攪拌し、その後水蒸気蒸留によってトルエンを除去し、これにより表面負荷電量0.115meqCOO⁻/gの赤色の標識着色粒子の懸濁液を得た。

【0016】＜感作着色粒子の調製＞上記標識着色粒子の懸濁液をリン酸緩衝液（以下「PBS」という）により固形分濃度が1重量%となるよう希釈して得られる標識着色粒子の分散液の1mlと、抗HBsモノクローナル抗体（日本バイオテスト研究所製）をPBSで100μg/mlとなるよう希釈して得られる抗体希釈液1mlとをエッペンドルフ遠沈管に採り、室温で2時間振とうして標識着色粒子にモノクローナル抗体を感作させ、次いで濃度0.1重量%のウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）を含有するPBSを用いて3回遠心沈降処理によって洗浄し、最終的に2mlとなるよう再懸濁させることにより、感作着色粒子の懸濁液を得た。＜クロマトグラフ媒体の調製＞モノマーとしてスチレン99.9重量部およびメタクリル酸0.1重量部を用いソーブフリー重合により得られたラテックス粒子のエマルジョンを固形分濃度が0.6重量%となるようPBSにより希釈し、その1mlと、抗HBsモノクローナル抗体を濃度が100μg/mlとなるようPBSにより希釈して得られた抗体希釈液1mlとをエッペンドルフ遠沈管に採り、室温で2時間振とうしてラテックス粒子に抗HBsモノクローナル抗体を感作させ、次いで濃度0.1重量%のBSAを含有するPBSを用いて3回遠心沈降処理二よって、洗浄し最終的に2mlとなるよう再懸濁させることにより、固相ラテックス粒子を調製した。次いで、ガラス繊維濾紙よりなる幅100mm、長

さ80mmの濾紙片の一端から15mmの位置に、上記固相ラテックス粒子の20μlを、自動薄層クロマトグラフサンプラー「リノマーIV」(CAMAG社製)を用いて窒素雰囲気中で塗布し、冷蔵庫中で乾燥することにより、反応部位を有するクロマトグラフ媒体を調製した。

【0017】<測定試験>検体として、ヘパリン血漿、EDTA血漿、及び血清を用いた。なお、ヘパリン血漿におけるヘパリン濃度は、通常の採血レベルのものであった。各検体は、30分以内のもの、1時間、2時間、5時間、および24時間後のものである。感作着色粒子の懸濁液を固形分濃度が0.0005%となるよう、濃度0.1重量%のBSA溶液と0.001重量%のポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含*

*有するPBSによって希釈し、この感作着色粒子希釈液の150μlに、上記各検体150μlを加えて攪拌した。得られた混合液をそのまま、あるいは特定スルホン化(共)重合体を0.5mg/mlとなるように添加した試験液を、幅10mmに切断した上記のクロマトグラフ媒体の固相ラテックス粒子を塗布した側の一端を下にして、当該下端を5mmだけ浸漬し、当該混合液を展開させた。5分間、60分間および24時間経過後、反応部位における感作着色粒子からの赤色シグナルを目視で比較した。特定スルホン化(共)重合体添加、特定スルホン化(共)重合体非添加それぞれについて、ヘパリン血漿、EDTA血漿、および血清をそれぞれ30検体ずつ使用して試験を行った。結果を表1に示す。

表1 非特異的反応試験

感作標識 微粒子	分析試料 タイプ	採血から 検査までの 時間(時間)	アッセイ時間		
			5分間	60分	24時間
感作着色 粒子/ 特定スルホン化 (共)重合 体非添加	ヘパリン 血漿	30分間	0	0	2
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	EDTA 血漿	30分間	2	12	17
		1時間	0	5	10
		2時間	0	1	2
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	血清	30分間	0	1	0
		1時間	0	2	2
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0

【0019】

表1のつづき

感作標識 微粒子	分析試料 タイプ	採血から 検査までの 時間(時間)	アッセイ時間		
			5分間	60分	24時間
感作着色 粒子/ 特定モノ化 (共)重合 体非添加	ヘリン 血漿	30分間	0	0	0
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	EDTA 血漿	30分間	0	0	0
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	血清	30分間	0	0	0
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0

【0020】実施例2

＜金コロイド粒子の調製＞濃度0.01重量%の塩化金水溶液200mlを沸騰させ、これに濃度1重量%のクエン酸ナトリウム水溶液を加え、溶液の色が薄い黄色から紫色ないし赤色に変わるまで加熱沸騰を行って、平均粒径が0.03 μ mの金コロイド粒子の分散液を調製した。

＜感作標識粒子の調製＞金濃度が0.01重量%である上記金コロイド粒子の分散液に炭酸カリウム溶液を加えてpHを7.6に調製し、これに抗HBsモノクローナル抗体を、金コロイド粒子分散液1ml当たり10 μ g

となる割合で加え、その10mlに濃度30重量%のBSAを0.1ml加え、遠心沈降処理して上澄み液を除去し、BSA濃度を0.1重量%で含有するPBSを用いて3回遠心沈降処理により洗浄し、再分散させることにより、モノクローナル抗体感作金コロイド粒子の分散液を調製した。

【0021】＜クロマトグラフ処理＞実施例1の感作着色粒子の代わりに上記のモノクローナル抗体感作金コロイド粒子を用いた他は、実施例1と同様にしてイムノクロマトグラフ測定を行った。結果を表2に示す。

【0022】

表2 非特異反応試験

感作標識 微粒子	分析試料 タイプ	採血から 検査までの 時間 (時間)	アッセイ時間		
			5分間	60分間	24時間
感作金 コロイド粒子/ 特定抗原化 (共) 重合 体非添加	ヘパリン 血漿	30分間	0	0	2
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	EDTA 血漿	30分間	3	15	19
		1時間	0	6	9
		2時間	0	1	1
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	血清	30分間	0	1	3
		1時間	0	0	1
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0

【0023】

表2のつづき

感作標識 微粒子	分析試料 タイプ	採血から 検査までの 時間 (時間)	アッセイ時間		
			5分間	60分間	24時間
感作金 コロイド粒子/ 特定抗原化 (共) 重合 体非添加	ヘパリン 血漿	30分間	0	0	2
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	EDTA 血漿	30分間	0	0	0
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0
	血清	30分間	0	0	0
		1時間	0	0	0
		2時間	0	0	0
		5時間	0	0	0
		24時間	0	0	0

【0024】

トグラフ法等の免疫学的測定法において、新鮮な血液あるいは血清または血漿を用い測定を行った場合であっても、非特異的結合反応などに起因すると考えられる擬陽性反応が起こるというような問題がない。したがって、

救急医療の分野で迅速かつ正確に検査することを可能にする。さらに、分析試料がどのようにして得られたかに関係なく、また測定従事者が手法に優れるか否かに関係なく、即座に正確な測定結果を得ることができる。